

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-293481

(43) 公開日 平成4年(1992)10月19日

(51) Int. Cl.	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 M 1/22		2104-4B		
3/00	A	9050-4B		

審査請求 未請求 請求項の数1(全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平3-81486

(22) 出願日 平成3年(1991)3月19日

(71) 出願人 591049875

サンフアイブ株式会社

鳥取県鳥取市湖山町東5丁目133番地

(72) 発明者 重政 好弘

鳥取県鳥取市美萩野1丁目48番地

(72) 発明者 田中 吉紀

鳥取県米子市錦町一丁目2313-6

(72) 発明者 谷川 季彦

鳥取県米子市中島28-9

(72) 発明者 指輪 仁之

鳥取県鳥取市湖山町西4丁目110 鳥取大学白浜宿舎RC-2-504

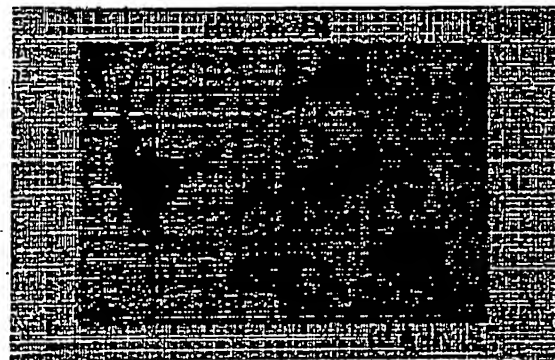
(74) 代理人 弁理士 和田 昭

(54) 【発明の名称】 細胞培養用シャーレ

(57) 【要約】

【構成】 キチン、キトサン、セルロースあるいはそれらの誘導体で内面コーティングした細胞培養用シャーレ。

【効果】 肝細胞、羊膜細胞など分化形質を有する細胞を良好な状態で培養することができ、また生体細胞を *in vivo* に近い状態で培養できる。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 キチン、キトサン、セルロースあるいはそれらの誘導体を内面にコーティングしたことを特徴とする細胞培養用シャーレ

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 この発明はキチン、キトサン、セルロースあるいはそれらの誘導体を内面にコーティングした細胞培養用シャーレに関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】 組織から分散させた細胞は、細胞培養では個々の細胞をそれぞれ個々の生物体として微生物集団と同様に取り扱うことを可能にする。更に細胞集団からクローンを選択することにより遺伝的により均一な組成をもつ細胞集団を得ることも可能である。

【0003】 現在細胞培養は組織培養の代表的な一分野であり、体細胞の遺伝学、生理学、生化学、分子生物学の研究上の有力な実験手段であるだけでなく、ワクチンの製造やインターフェロンその他細胞の生産物の生成など応用面でも価値が大きい。

【0004】 生物体内で組織を構築している細胞が培養系に移された場合、生命活動を維持するためには、基質に接着することが必要である。体内で基質の役割を担っているものは細胞外基質と総称される物質である。

【0005】 細胞外基質の主要成分は、コラーゲン、プロテオグリカン、エラスチン、ヒアルロン酸及びフィブロネクチンやラミニンに代表される細胞接着性糖蛋白質である。複雑な組成の細胞外基質をそのまま利用することにより、各種細胞の長期培養、分化形質の発現、機能保持など、いままでにはできなかった培養系が可能となっている。生体組織から直接調製するものとしてbiomatrixがある。

【0006】 細胞接着活性をもつ人工合成物質をデザインして、培養基質として用いる手法が開発されつつある。人工物質は熱安定性に優れ、一定品質のものを安定供給できる利点をもつ。以前からポリリジンのコートが、神経細胞の培養に利用されている。

【0007】 ラクトースを側鎖にもつ重合体(PVL A)は肝細胞の接着物質として開発された。また、側鎖にセロピオースをもつ重合体(PVCA)が、血管内皮細胞の接着基質として開発されている。

【0008】 一方、細胞が接着・伸展する、培養に適した容器(材料表面)の開発には、たゆまぬ努力が注がれている。1960年以前はガラス容器が主に用いられていたが、現在では、使いやすさ、再現性のよさなどの点で、表面処理(プラズマ放電で表面を酸化処理など)を施したポリスチレン製の使い捨て容器が広汎に用いられている。

【0009】 人工基質の開発は細胞と材料表面の相互作用を人工的に制御して医療用に用いることができた

め、今後利用されるであろう多くの細胞とそれらに適した人工基質、材料表面の開発が期待されている。

## 【0010】

【発明が解決しようとする課題】 細胞は、細胞外基質に接着した後、増殖あるいは分化形質を発現する。接着そのものは、細胞の増殖や分化に必要なが、十分条件ではない。各種細胞は種々の細胞外基質に接着するが、その後の細胞の反応は接着性のよしあしで決まらないことが多い。このことは、任意の細胞には、接着、増殖、あるいは分化形質の発現に適した任意の細胞外基質があることを示している。

【0011】 生物体内で組織を構築している細胞が培養系に移された場合、生命活動を維持するためには、基質に接着することが必要である。そのため、生体内で基質の役割を担っているもの(細胞外基質)や人工物質をデザインした基質を用いて種々の組織由来の細胞をin vivoに近い状態で培養する手法の開発が要求されている。

【0012】 キチンは、甲殻類、昆虫類の組織支持体として自然界に広く分布して存在する天然ムコ多糖類である。このキチンは、リゾチームにより加水分解されることから生分解性高分子として近年注目を集めている。

【0013】 このキチンの生体内消化性を利用してキチンを手術用縫合糸(特開昭57-171712)、創傷被覆保護剤(特開昭61-240963)などの医用材料に応用する研究が盛んに行なわれている。

【0014】 また、キチンの部分脱アセチル化物、及びその他の誘導体において著しい免疫賦活性を発現することも見出されている。

【0015】 更に、キチンを一成分とする生体内充填剤は非常に良好な組織適合性を示し、動物に対する創傷治療効果能を有することが認められている。

【0016】 しかしながら、このキチンの創傷治療効果に対するメカニズムについては現在のところ全く不明であり、その解明のためには生体細胞をなるべくin vivoに近い状態で培養できるような容器、装置の開発が必要不可欠である。

【0017】 一方、セルロースは天然に豊富に存在する多糖であり、それらのアルキル、アシル誘導体は広く医用材料に用いられている。

## 【0018】

【課題を解決するための手段】 この発明は、キチン、キトサン、セルロースあるいはそれらの誘導体に対して生体に存在する細胞のin vivoでの挙動をin vitroで追及することができ、更に肝細胞、羊膜細胞など分化形質を有する細胞を良好な状態で培養できるなどの機能を有するようなキチン、キトサン、セルロースあるいはそれらの誘導体(以下、これらを基質と呼ぶ)を細胞培養用及び組織培養用のシャーレにコーティングした細胞培養用シャーレを得ることを目的とする。

## 【0019】

3

【作用】以下、基質をコーティングしたこの発明のシャーレについて詳しく説明する。

【0020】1-3%の基質の辛酸溶液(1ml以下)をベトリディッシュ(一般細菌用)1008(日本ベクトン・ディッキンソン社、35x10mm)【ポリスチレンシャーレ(細菌培養用)】及び、ファルコン組織培養ディッシュ3001(日本ベクトン・ディッキンソン社、35x10mm)【ポリスチレンシャーレ(組織培養用)】へ注ぎ、底面に均一に塗布した。次に、このシャーレを室温で1時間~1日放置し、フィルムが収縮しない程度に辛酸を蒸発させた。

【0021】その後、シャーレ内にエタノール、メタノール等のアルコール類と水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等の水酸化物水溶液との混合溶媒(8/1~1/1 v/v)、アルコール類とアンモニア水などの有機塩基水溶液との混合溶媒(6/1~1/1 v/v)、あるいはエタノール、メタノール等のアルコール溶媒、好ましくはメタノールまたはメタノール/1M水酸化ナトリウム水溶液(4/1 v/v)の混合溶媒を1~10ml注ぎ、0.5~2時間放置した。

【0022】メタノールで2、3回洗浄後、コートしたフィルムの様子をみながら0.5~2時間風乾した。尚、この際乾燥し過ぎるとフィルムの一部がシャーレからはがれる。最後にシャーレを蒸留水で十分に洗浄し、細胞培養試験に用いた。この方法で調製したシャーレはフィルムの接着性、透明度共に良好であった。

【0023】アセチルセルロース-イソシアネート共重合体はジメチルスルホキシド(DMSO)あるいはDMFとアルコールとの混合溶媒(1/2~3/1 v/v)、好ましくはDMSO/メタノール(1/1 v/v)混合溶媒に共重合体(0.1~1.0%)を溶解し、その0.2~1.0mlをシャーレに塗布し、減圧乾燥後、蒸留水で洗浄した。

【0024】直径35mmのポリスチレンシャーレ(細菌培養用)、ポリスチレンシャーレ(組織培養用)及びこの発明の細胞培養用シャーレを用いて細胞培養試験を行なった。

【0025】細胞として、マウス繊維芽細胞3T3(JCRB)とマウスマクロファージ株A640-BB-2(谷川ら、J. Cell. Physiol. 120, 242, 1984)を使用した。ポリスチレンシャーレ(細菌培養用)、ポリスチレンシャーレ(組織培養用)並びにキチン、キトサン、セルロースあるいはそれらの誘導体をコーティングしたシャーレそれぞれに上記細胞を $2 \times 10^5$ 個播いた。

【0026】尚、ダルベッコ改良イーグル培地にウシ胎児血清を7.5%量となるように加えた。マウス繊維芽細胞3T3は37℃、マウスマクロファージ株A640-BB-2は39℃の炭酸ガス培養器で5日間培養した。

【0027】培養1日目と5日目に各シャーレを2%ホルマリンと100%メタノールで固定し、ギムザ染色し、光学顕微鏡(400倍)で観察した。

【0028】キチン、キトサン、セルロースあるいはそ

4

これらの誘導体の創傷治癒効果に対するメカニズムの解明については以下の方法で検討した。

1) 生体の炎症局所より採取した浸出液をキチン誘導体でコーティングしたシャーレに撒いて、培養液を加え、37℃で数日間培養し、細胞の種類や数、形態の特徴等を観察する。

2) 炎症部位に浸出してくると考えられている多形核白血球、単球、リンパ球、あるいは創傷治癒に関係する繊維芽細胞などの株化細胞を本シャーレに撒いて、付着性、増殖性、機能の発現の有無、細胞の活性化の程度(生理活性物質の分泌の有無)などを検討する。

3) これらの結果を統合することにより、炎症局所における体液性変化、細胞変化を具体的に把握することができ、炎症局所の反応の推定を可能にすると共に創傷治癒におけるキチンの働きを理解する。

【0029】

【実施例】以下、実施例をあげてこの発明を更に詳しく説明する。

【0030】実施例1

1%のイカ甲キチン辛酸溶液(0.3ml)をポリスチレンシャーレ(組織培養用)内へ注ぎ、底面に均一に塗布し、室温で1時間放置した。その後、シャーレ内にメタノールを5ml注ぎ、30分放置した。メタノールで2、3回洗浄後、30分放置した。最後にシャーレを蒸留水で十分に洗浄してこの発明の培養用シャーレを得、細胞培養試験に用いた。

【0031】上記で得たこの発明のシャーレでマウス繊維芽細胞およびマウスマクロファージ株の培養を行ない、その結果を光学顕微鏡(400倍)で観察したところ、マウス繊維芽細胞は、1日目には図1のように細胞が十分伸展し、5日目には図2のように増殖してシャーレ全体を覆い尽くした。マウスマクロファージ株については、図3のように培養1日目に細胞の形態は蕈足樹枝状に変化した。

【0032】実施例2

脱アセチル化度27%の部分脱アセチル化キチン(DAC-27)の1%辛酸溶液(0.3ml)を特殊加工したポリスチレンシャーレへ注ぎ、底面に均一に塗布し、室温で約5時間放置した。

【0033】その後、シャーレ内にメタノール/1M水酸化ナトリウム水溶液(4/1 v/v)混合溶媒を5ml注ぎ、2時間放置した。メタノールで2、3回洗浄後、2時間放置した。最後にシャーレを蒸留水で十分に洗浄して培養用シャーレを得、細胞培養試験に用いた。

【0034】同様の方法で、脱アセチル化度66%及び88%の部分脱アセチル化キチン(DAC-66及びDAC-88)についてもシャーレを調製し、細胞培養試験に用いた。

【0035】部分脱アセチル化キチン(DAC-27、DAC-66、DAC-88)をコーティングしたシャ

6

ーレで培養したところ、マウス繊維芽細胞の接着性に差が見られた。即ち、DAC-88>DAC-27>DAC-66の順に良好な接着性を示し、用いる基質の種類により細胞の接着性をコントロールできた。

【0036】マウスマクロファージ株に対する接着性は、DAC-27、DAC-88の場合、イカ甲キチンの時と同様の細胞の義足樹枝状の変化が認められた。しかし、DAC-66の場合は、細胞は丸いままだった。

#### 【0037】実施例3

0.5%のアセチルセルロース-ジフェニルメタンジイソシアナート(MDI)ブロック共重合体のDMSO-メタノール(1:1)混合溶液(0.3ml)をポリスチレンシャーレ(組織培養用)へ注ぎ、底面に均一に塗布し、室温で4時間、続いて70℃で2時間真空乾燥した。その後、シャーレを蒸留水で十分に洗浄し、細胞培養試験に用いた。

【0038】アセチルセルロース-MDIブロック共重合体をコーティングしたシャーレで培養したところ、マウス繊維芽細胞は、1日目には細胞が十分伸展し、5日目には増殖してシャーレ全体を覆い尽くした。マウスマクロファージ株についても、培養1日目には細胞は十分に伸展していた。細胞の着床能、増殖状態は従来用いられているポリスチレンシャーレ(組織培養用)よりも優れていた。

#### 【0039】比較例1

ポリスチレンシャーレ(細胞培養用)を用いて各種細胞を培養したところ、マウス繊維芽細胞は、細胞の着床性が悪く、培養には適さなかった。マウスマクロファージ株についても細胞の着床性が悪かった。

#### 【0040】比較例2

ポリスチレンシャーレ(組織培養用)を用いて各種細胞を培養したところ、マウス繊維芽細胞は、1日目には図4のように、細胞が十分伸展し、5日目には図5のように増殖してシャーレ全体を覆い尽くした。マウスマクロファージ株についても1日目で図6のように細胞が十分伸展した。

#### 【0041】

【発明の効果】この発明において作製した基質コーティングシャーレで培養しても、細胞親和性が良好で、細胞に対する毒性が全くないことが認められた。また、細胞がシャーレに付着しやすくなっているため、生存し続けている細胞が多くなり、形態の観察も容易であった。

【0042】マクロファージの株をイカ甲キチンコーティングシャーレで培養した際に、マクロファージの形態がポリスチレンシャーレ(組織培養用)で培養したときと異なった特徴が認められたことから、前述の動物に対する創傷治癒効果との関連性が示唆される。

6

【0043】キチンあるいはキチン誘導体による持続的な刺激により従来認められなかった活性化等が期待できる。

【0044】これらの基質でコーティングしたシャーレはいずれも透明度が良く、ギムザ染色による細胞の染色性にも影響しないことから、細胞培養用のシャーレとして広範囲の用途に有用である。

【0045】更に、本発明により下記のような社会的効果が期待される。

1) キチン及びキチン誘導体が手術用縫合糸、創傷被覆保護剤などの医用材料に应用されているが、キチン及びキチン誘導体の組織や細胞に及ぼす直接的な影響をシャーレ内で再現することにより、基礎的データを得ることが可能となる。

2) いままで以上に多種類のシャーレを用意することにより、今までシャーレの中では培養維持が困難であった細胞(分化形質を有する細胞：肝細胞、羊膜細胞など)が、良好な状態で培養することが可能である。又、今までのシャーレでは認められなかった性状の細胞を見出すことができる期待できる。更に、分化形質を有するマクロファージがこのシャーレで培養できたことから、分化した形質を失わずにこれらの細胞を長期間培養できることも示唆される。

3) より広範囲の動物細胞をキチンあるいはキチン誘導体コーティングシャーレで培養できれば、培養細胞を使用することにより、余分な動物を犠牲にする必要がなくなり、動物愛護の面からも望ましいことであろう。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】マウス繊維芽細胞3T3をこの発明のシャーレを用いて培養した培養1日目の形態を示す光学顕微鏡写真(400倍)である。

【図2】マウス繊維芽細胞3T3をこの発明のシャーレを用いて培養した培養5日目の形態を示す光学顕微鏡写真(400倍)である。

【図3】マウスマクロファージ株A640-BB2をこの発明のシャーレを用いて培養した培養1日目の形態を示す光学顕微鏡写真(400倍)である。

【図4】マウス繊維芽細胞3T3をポリスチレンシャーレ(組織培養用)を用いて培養した培養1日目の形態を示す光学顕微鏡写真(400倍)である。

【図5】マウス繊維芽細胞3T3をポリスチレンシャーレ(組織培養用)を用いて培養した培養5日目の形態を示す光学顕微鏡写真(400倍)である。

【図6】マウスマクロファージ株A640-BB2をポリスチレンシャーレ(組織培養用)を用いて培養した培養1日目の形態を示す光学顕微鏡写真(400倍)である。

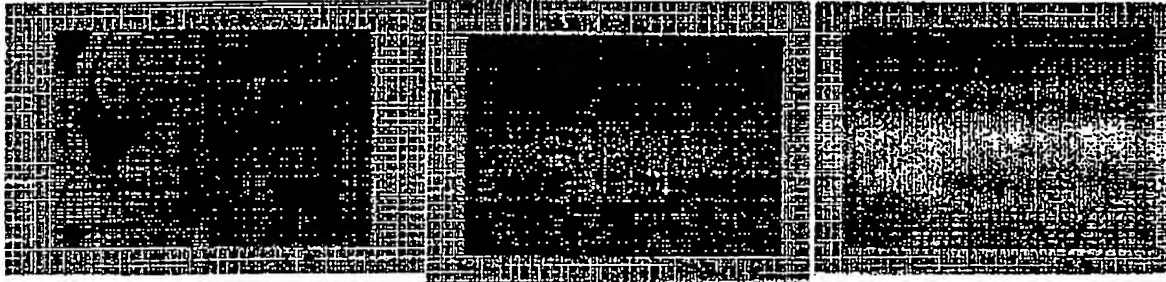
(5)

特開平4-293481

【図1】

【図2】

【図3】



【図4】

【図5】

【図6】

